

Aus der Veterinär-medizinischen Klinik der Universität
Zürich

Direktor: Prof. Dr. P. F. Suter

Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. H. Keller

Evaluation eines ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* im Blut und in der Milch von Schweinen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

ANTON EBERLI

Tierarzt

von

Altwis/LU

Genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. H. Keller, Referent

Prof. Dr. H. Bertschinger, Korreferent

Zürich 1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507228_0028

Meiner lieben Frau gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1. Einleitung</u>	3
<u>2. Material und Methoden</u>	4
2.1. Antigen	4
2.2. ELISA	5
2.3. Berechnung der Nettoextinktion und Beurteilung der ELISA-Reaktion	5
2.4. Blutentnahmen	6
2.5. Reaktionsverlauf bei künstlich in- fizierten Sauen und ihren Würfen	6
2.5.1. Versuchsstall	6
2.5.2. Versuchstiere	7
2.5.3. Inokulation	7
2.5.4. Blutproben	8
2.5.5. Milchproben	8
2.6. Serologische Querschnittsunter- suchungen	9
2.7. Untersuchungen bezüglich der Korrelation zwischen ELISA-Reaktion und pathologisch-anatomischen Lungenbefunden (Korrelationsuntersuchungen)	12
<u>3. Resultate</u>	13
3.1. Vorbemerkungen	13
3.2. Infektionsversuche	14
3.3. Serologische Querschnittsuntersuchungen	24
3.3.1. Kategorie A	24
3.3.2. Kategorie B	24
3.3.3. Kategorie C	28
3.3.4. Kategorie D	30
3.3.5. Kategorie E	30
3.4. Korrelationsuntersuchungen	35
<u>4. Diskussion</u>	37
<u>5. Zusammenfassung</u>	42
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	43

1. Einleitung

Mehr als 20jährige Erfahrungen mit dem schweizerischen SPF-Programm haben gezeigt, dass Infektionen mit Mycoplasma hyopneumoniae (Erreger der Enzootischen Pneumonie = EP) in SPF-Herden unter Umständen monatelang latent verlaufen können (Keller, 1973 und 1980). Ähnliche Erfahrungen wurden auch in England gemacht (Goodwin, 1984). Akute und chronische Krankheitsstadien der EP lassen sich in der Routinediagnostik anhand der Lungenläsionen (makroskopische und histologische) sowie unter Zuhilfenahme einfacher Erregernachweismethoden (z.B. Lungenabklatschverfahren nach Whittlestone, 1957, Nachweis von M.hyopneumoniae mittels fluoreszierender Antikörper (L'Ecuyer und Boulanger, 1970) mehr oder weniger gut erfassen.

Bei latentem Infektionsverlauf hingegen versagen aus naheliegenden Gründen diese herkömmlichen Diagnostikverfahren vollständig.

Seit Jahren wird daher versucht, mit Hilfe serologischer Methoden die EP-Diagnostik zu verbessern. Bereits 1968 berichtete Roberts über den Nachweis von Antikörpern mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion. 1969 beschrieben Goodwin et al. einen indirekten Hämagglutinationstest. Bruggmann et al. (1977) verwendeten als erste die ELISA-Technik zum Nachweis von M.hyopneumoniae-Antikörpern. Die in serologische Tests gesetzten hohen Anfangserwartungen erwiesen sich jedoch im Nachhinein immer wieder als zu optimistisch. In der Feldprüfung ergaben Kreuzreaktionen mit andern Schweine-Mykoplasmen sowie unspezifische Reaktionen häufig Anlass zu schwer interpretierbaren Befunden. Um die Spezifität eines ELISA zu erhöhen, wurden sowohl von Bruggmann als auch von andern diverse Antigenpräparationen hergestellt. Mit der vorliegenden Arbeit sollte abgeklärt werden, ob sich mit Hilfe eines von Nicolet et al. (1980) präparierten Antigens die erwähnten Schwierigkeiten eliminieren lassen.

Zu diesem Zweck wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Infektionsversuche, um den späteren Verlauf der ELISA-Reaktion im Serum und in der Milch von experimentell infizierten Sauen und deren natürlich infizierten Nachkommen über längere Zeit verfolgen zu können.
2. Serologische Querschnittsuntersuchungen, um in Betrieben mit unterschiedlichem EP-Status (EP-frei, latente EP, chronische EP, floride EP) einen Ueberblick über Häufigkeit und Stärke allfälliger Reaktionen bei Tieren verschiedener Alterskategorien zu erhalten.
3. Untersuchungen, um abzuklären, inwieweit beim EP- befallenen Einzeltier ELISA-Reaktion und pathologisch- anatomischer Lungenbefund übereinstimmen (Korrelationsuntersuchungen).

2. Material und Methoden

2.1. Antigen *

Als Antigen dienten ausschliesslich bestimmte M.hyopneumoniae-Membranproteine, die mit Tween 20 extrahiert worden waren. Eine eingehende Beschreibung der Antigenherstellung findet sich in der Arbeit von Nicolet et al. (1980).

* Das Antigen wurde uns in verdankenswerter Weise von Herrn Prof. Nicolet, Institut für Veterinär-Bakteriologie der Universität Bern, zur Verfügung gestellt.

2.2. ELISA

Die Antikörperbestimmungen erfolgten nach der Methode von Engvall und Perlmann (1972). Für die Prüfung der Seren standen Mikrotiter-Platten (Cooke, Dynatech Laboratories Inc., 900 Slaters-Lane, Alexandria, Virginia 22314) zur Verfügung. Jedes Serum wurde auf der gleichen Platte zweimal aufgetragen (Verdünnung 1:200 in PBS-Puffer). Insgesamt konnten pro Platte 32 Prüfseren getestet werden (Doppelbestimmung). Zur Kontrolle wurden auf jeder Platte 5 x 2 Dellen mit einem negativen, 1 x 2 Dellen mit einem positiven Serumpool und 2 x 2 Dellen mit 2 positiven Kontrollseren beschickt.

Der negative Serumpool setzte sich zusammen aus 2 Seren von SPF-Primärschweinen (kolostrumfrei aufgezogene, über Hysterotomie gewonnene Schweine) und 3 Seren von SPF-Sekundärtieren, die aus EP-unverdächtigen SPF-Herden stammten.

Zwei positive Kontrollseren wurden uns von Prof. Nicolet zu Verfügung gestellt. Ein dritter positiver Serumpool setzte sich zusammen aus den Seren von 4 eigenen Versuchsschweinen und 2 natürlich mit M.hypopneumoniae infizierten Tieren.

2.3. Berechnung der Nettoextinktion und Beurteilung der ELISA-Reaktion

Alle Extinktionswertmessungen wurden bei 404 nm durchgeführt. Anhand des arithmetischen Mittels der 5 Doppelmessungen des negativen Serumpools ($\bar{x}$) und der doppelten Standardabweichung ($2s$) wurde der Nullwert folgendermassen definiert:

$$\text{Nettoextinktion } 0 = \bar{x} + 2s$$

Die Nettoextinktion (y) der positiven Kontrollseren und der 32 Prüfseren pro Platte wurden wie folgt ermittelt:

$$y = \bar{M} - (\bar{x} + 2s). \quad (\bar{M} = \text{arithmetisches Mittel aus der Doppelbestimmung jedes Prüfserums}).$$

Beurteilung der Reaktionen

- $y \leq 0$: negative Reaktion
 $y = 0 - 0.05$: fraglich positive Reaktion
 $y > 0.05$: positive Reaktion

2.4. Blutentnahmen

Blutentnahmen erfolgten an lebenden Tieren in der Regel aus der V.brachiocephalica. Gelegentlich fand eine andere Technik Anwendung:

Nach einem Lanzettenstich in eine Ohrvene wurden Blutproben in ein Hämatokritröhrchen von 75 mm Länge und 1.1 mm Durchmesser aufgesogen.

Bei Schlachtschweinen erfolgten die Blutentnahmen beim Entbluten. Die Proben wurden innert 24 Stunden nach der Gewinnung zentrifugiert und bis zur Untersuchung bei minus 20°C tiefgefroren. Der grösste Teil der Seren konnte aus technischen Gründen erst 2 Jahre nach der Entnahme getestet werden.

2.5. Reaktionsverlauf bei künstlich infizierten Sauen und ihren Würfen

2.5.1. Versuchsstall

Der Stall, in dem die Tiere während der ganzen Dauer des Versuches untergebracht waren, bestand aus einem einzigen Raum. Er war gegenüber der Umwelt gut abgeschirmt und konnte nur über eine Schleuse (stalleigene Ueberkleider, Hände- und Stiefeldesinfektionsmöglichkeiten) betreten werden. Im Umkreis von 400 m befanden sich keine andern Schweine.

2.5.2. Versuchstiere

Für die Versuche wurden aus einem SPF-Sekundärbetrieb vier trächtige Erstlingssauen angeschafft (Sauen Nr. 1-4) und unmittelbar danach experimentell infiziert. Zwei Monate später warfen die Sauen Nr. 1, 2 und 4 23 lebende Ferkel, von denen zwei innert der ersten zwei Lebenstage und eines nach 4 Wochen erdrückt wurden. Die Sau Nr. 3 gebar 3 Monate post inoculationen 13 Ferkel, von denen eines am ersten Tag starb. Zwei weitere kümmernten und wurden im Alter von 4 Wochen aus dem Versuch genommen. Die Säugezeiten variierten zwischen 49 und 55 Tagen. Nach dem Absetzen wurden die 4 Sauen geschlachtet und die verbleibenden 30 Ferkel an Ort ausgemästet. Sie erreichten das Schlachtgewicht von ca. 100 kg im Alter von 6 - 8 Monaten (siehe Tabellen 3 bis 6, Seite 15 - 18).

2.5.3. Inokulation

Die Sauen wurden mit 10 ml Lungensuspension inokuliert. Das Ausgangsmaterial stammte von einem SPF-Primärschwein (colostrum deprived pig), welches mit einem auf Friis-Medium gezüchteten Wildstamm von M.hyo pneumoniae (2.Passage) infiziert worden war und bei der Sektion frische EP-bedingte Lungenveränderungen aufgewiesen hatte. Das Inoculum enthielt M.hyo pneumoniae in grosser Zahl, aber keine andern Bakterien. Die Suspension war aus verändertem Lungengewebe durch Verdünnung mit steriler 0.85% NaCl Lösung (1:10) hergestellt worden. Die Inokulation erfolgte intranasal mit Hilfe eines Plastikkatheters.

2.5.4. Blutproben

Die erste Blutentnahme erfolgte bei den Sauen vor der Inokulation, weitere folgten bis zur Geburt in Abständen von 7 - 10 Tagen. Post partum wurden die Tiere in wöchentlichen Abständen geblutet. Bei den Ferkeln fanden die Blutentnahmen nach folgendem Zeitplan statt:

- Unmittelbar nach der Geburt, jedoch vor der Kolostrumaufnahme.
- 12, 24, 36 und 168 Stunden post partum.
- bis zum Gewicht von 30 kg im Abstand von 1 Woche.
- ab 30 kg bis zur Schlachtung im Abstand von 2 Wochen.

2.5.5. Milchproben

Jeder Sau wurde bei der Geburt sowie nach 12, 24, 36, 72 und 168 Stunden und hierauf in wöchentlichen Abständen bis zur Schlachtung eine Sammelmilchprobe aus verschiedenen Drüsenpaketen entnommen. Um das Einschiessen der Milch zu provozieren, erhielten die Tiere 10 IE eines synthetischen Oxytocinpräparates * i.v.verabreicht.

Die Proben wurden im Kühlschrank aufbewahrt und spätestens innert 24 Stunden wie folgt aufgearbeitet: Nach Zugabe von 3 Tropfen Labextrakt/ml Milch und einer 20minütigen Inkubation bei 42°C wurden sie bei 4°C bei 3000 g während 10 Minuten zweimal hintereinander zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde bis zur Untersuchung bei minus 20°C tiefgefroren aufbewahrt.

* Firma Stricker AG, 3052 Zollikofen

2.6. Serologische Querschnittsuntersuchungen

Für serologische Querschnittsuntersuchungen standen 17 in der Zentralschweiz gelegene Schweinezuchtbetriebe zu Verfügung, die sich bezüglich Vorkommen und Verlauf der EP folgenden fünf Kategorien zuordnen liessen:

- Kategorie A : Konventionelle, EP-infizierte Betriebe mit nicht genau bekannter Vorgeschichte. Die Diagnose EP stützt sich auf die Anamnese und das klinische Bild.
- Kategorie B : Ehemalige SPF-Betriebe mit florider EP. Die Diagnose stützt sich auf die pathologisch-anatomischen, insbesondere auf die histologischen Lungenveränderungen sowie auf den mikroskopischen Erregernachweis in Ausstrichen von Bronchialschleim.
- Kategorie C : Ehemalige SPF-Betriebe mit subklinischem Verlauf einer M.hyopneumoniae-Infektion.
- Kategorie D : SPF-Betriebe ohne Anhaltspunkte für EP.
- Kategorie E : SPF-Primärbetriebe (Aufbau der Herden direkt über Hysterotomie).

Tabelle 1 enthält nähere Angaben über die in die Untersuchung einbezogenen Betriebe.

Um repräsentative Bestandesprofile zu erhalten, wurden zu ungefähr gleichen Teilen Blutproben bei Schweinen folgender 6 Alterskategorien entnommen:

- Ferkel bis zum Alter von 7 Tagen.
- Ferkel zum Zeitpunkt des Absetzens (4 - 6 Wochen alt).
- Ferkel im Gewicht von ca. 20 kg (8 - 10 Wochen alt).

- Läufer Schweine (Jäger) 40 - 60 kg (3 - 4 Monate alt).
- Zuchtreuonten oder Schlachtschweine um 100 kg (6 - 8 Monate alt).
- Zuchttiere.

In kleineren Betrieben wurden sämtliche, in grösseren mindestens ein Drittel der Zuchtsauen in die Untersuchung einbezogen. Die Auswahl der Tiere erfolgte bei allen Alterskategorien zufällig. Im einzelnen Betrieb wurden alle Blutproben am gleichen Tag gesammelt.

Bezüglich der Kategorie E erscheinen folgende Bemerkungen angezeigt:

Beim Betrieb E1 handelt es sich um die SPF-Primäraufzuchtstation Ellbach (Koch, 1980). Diese Anlage wird in 4 Schüben im Abstand von 11 Wochen mit Ferkeln bestossen, die über Hysterotomie gewonnen werden. Bei Vollbesatz stehen ca 280 Schweine (4 Alterskategorien) auf dem Betrieb. Elf Monate nach der Anlieferung der ersten Ferkel verlassen alle Tiere die Station. Die ältesten Jungsauen sind dann 10 - 14 Wochen trächtig, und die jüngsten Schweine 11 Wochen alt.

Nach einer solchen Serie wird die Station gereinigt und für mindestens 6 Wochen leer gehalten. PE_1 bedeutet die erste, PE_2 die zweite und PE_3 die dritte Serie.

Ein Teil der Tiere aus der Serie PE_1 wurde in der Aufzuchtstation zweimal untersucht, am 8.3.1978 diejenigen der zwei ersten Aufzuchtgruppen und am 27.7.1978 (vor der Leerung der Station) der Gesamtbestand (4 Aufzuchtgruppen).

Diese Schweine dienen dem Aufbau der SPF-Primärstation E2, wo 11 Monate später eine dritte Blutentnahme erfolgte.

Tabelle 1 Übersicht über die in die serologischen Querschnittsuntersuchungen
einbezogenen Betriebe

Be- trieb	Betriebsgrösse		Gründung der Herde	EP-Situation		Datum der Blutent- nahme
	Mutter- sau	R* M*		Datum EP- Ausbruch	Husten zum Zeitpunkt der Blutent.	
A1	25	80 M	Unbekannt	siehe Seite (9)	Sporadisch bei Ferkeln und Mastschweinen	28.12.78
A2	16	60 M	unbekannt			18.12.78
A3	39	300 M	unbekannt		bei Mastschw.	7. 7.78
B1	24	14 R	1965	8.67	im Batterie- stall	3. 6.78
B2	90	35 R	1974	1.78	im Batterie- stall	14. 3.78
B3	30	80 R	1979	12.79	deutl.im ganzen Bestand	17.12.79
B4	40	30 R	1974	11.76	sporadisch bei allen Alters- gruppen	7. 6.78
B5	40	140 M	1973	6.77	im Batterie- und Maststall	20. 4.78
C1	36	160 M	1974	6.74	Vereinzelt bei Absetzferkeln	9. 3.78
C2	25	150 M	1973	2.75	-	21. 3.78
C3	25	10 R	1977	1.78	-	2.2./2.3.78
D1	33	150 M	1975	frei(SPF)	-	16. 3.78
D2	8	40 M	1966	frei(SPF)	-	10. 5.78
D3	30	180 M	1973	frei(SPF)	-	5. 6.78
D4	49	45 M	1972	frei(SPF)	-	12. 4.78
E1 PE ₁	-	137 R	8.77-1.78	frei(SPF)	-	8. 3.78
PE ₁	54**	198 R	8.77-4.78	frei(SPF)	-	27. 7.78
PE ₂	47**	171 R	8.78-4.79	frei(SPF)	-	9. 7.79
PE ₃	46**	203 R	7.79-3.80	frei(SPF)	-	23. 6.80
E2	80	80 R	7.78	frei(SPF)	-	7. 6.79

* R = Zuchttremonten, * M = Mast

** trächtige Jungsau

2.7. Untersuchungen bezüglich der Korrelation zwischen ELISA-Reaktion und pathologisch-anatomischen Lungenbefunden (Korrelationsuntersuchungen)

Für diese Untersuchungen wurden 10 mit EP infizierte Mastbetriebe ausgewählt. In den Betrieben K1 bis K8 verlief die Krankheit chronisch, in den Betrieben K9 und K10 dagegen war sie akut ausgebrochen. Insgesamt standen 262 Schlachtschweine (ca 100 kg LG) zur Verfügung. Die Zahl der untersuchten Schweine pro Betrieb schwankte zwischen 4 und 50 Stück. Aus den Betrieben K2 und K3 gelangten in Abständen von 3 bzw. 6 Monaten je zweimal Tiere zur Schlachtung (Schub A und B).

Dank einer individuellen Tätowierung der Tiere liessen sich die am Schlachtband erhobenen Lungenbefunde den einzelnen Blutproben zuordnen.

Die Lungen wurden makroskopisch bezüglich EP-verdächtigen Läsionen beurteilt. Zur Sicherung der Diagnose EP gelangten pro Betrieb 2 - 4 veränderte Lungenstücke zur bakteriologischen (Mykoplasmen-Nachweis nach Whittlestone) und histologischen Untersuchung*.

* Die Untersuchungen wurden in verdankenswerter Weise am Veterinär-bakteriologischen Institut der Universität Zürich (Direktor: Prof.Dr.Dr.h.c. E. Hess) und am Institut für Veterinärpathologie (Direktor: Prof.Dr.Dr.h.c.H. Stünzi) durchgeführt.

3. Resultate

3.1. Vorbemerkungen

Vorausschickend sei hier folgendes festgehalten:

Alle Seren - insgesamt über 2500 - wurden bekanntlich einer Doppelbestimmung unterzogen. Dabei zeigte sich, dass die Extinktionswerte der beiden Proben auf der gleichen Platte je nach Delle z.T. Abweichungen von mehr als 0,05 ergaben. War dies der Fall, so erfolgte eine Nachuntersuchung auf einer andern Platte. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die Messwerte von Platte zu Platte erhebliche Abweichungen aufweisen konnten. Die Differenzen fielen bei negativen Seren offenbar geringer aus als bei positiven. Auf jeder Platte wurde der 0-Wert mit Hilfe des negativen Poolserums neu bestimmt. Die extremsten Schwankungen der Extinktionswerte des negativen Poolserums von Platte zu Platte lagen im Bereich von 0.1. Bei positiven Seren fielen indessen die Unterschiede z.T. wesentlich stärker aus, was anhand der untenstehenden Tabelle 2 gezeigt werden kann.

Tabelle 2 Extremste Schwankungen der Nettoextinktionswerte auf zwei verschiedenen Testplatten

Platte	Nettoextinktionswerte der positiven Kontrollseren		
	Nr. 8	Nr. 19	Serum-pool
Nr. 19	0.037	0.007	- 0.016
Nr. 104	0.602	0.488	0.690

Es liegt auf der Hand, dass Abweichungen dieser Art die errechneten Titer z.T. namhaft beeinflussen konnten.

3.2. Infektionsversuche

Die Resultate der Infektionsversuche sind in den Tabellen 3 - 6 sowie in den Abbildungen 1 - 5 zusammengestellt.

Die experimentell infizierten Sauen zeigten 18 - 20 Tage post inoculationem Husten, der indessen innert 3 - 4 Wochen, d.h. noch vor den Geburtsterminen wieder verschwand. Einzig die Sau Nr.2 hustete während 8 Wochen und somit über den Geburtstermin hinaus.

Schon 2 Wochen post infectionem wiesen alle 4 Sauen positive ELISA-Reaktionen auf. Die Sauen 1 und 2 reagierten bis knapp zur Schlachtung (4 Monate post inf.) positiv. Bei der Sau Nr. 3 wurde bereits 11 Wochen nach der künstlichen Infektion wieder eine negative Reaktion beobachtet. Allerdings war später nochmals vorübergehend eine schwach positive Reaktion zu verzeichnen. Noch schwächer reagierte die Sau Nr. 4, bei der sich nur während etwa eines Monats ein positiver Nettoextinktionswert nachweisen liess, d.h. die klinischen Symptome (Husten) und eine positive ELISA- Reaktion verschwanden etwa gleichzeitig. Die Ferkel der Sauen 1 und 2 zeigten 14 Tage post partum Husten. Aus Nasentupferproben konnten keine Bordetellen isoliert werden. Die Ferkel der Sau Nr. 3 begannen 3 Wochen und diejenigen der Sau Nr. 4 sechs Wochen nach der Geburt zu husten. Die Hustenphase dauerte in den Würfen 1, 2 und 3 ca. 2½ Monate, im Wurf 4 nur 1 Monat.

Die Reaktionsverlaufskurven der 4 Würfe lassen erkennen, dass alle Ferkel mit kolostralen Antikörpern versorgt worden waren, jedoch in unterschiedlichem Ausmass. Je höher der durchschnittliche Nettoextinktionswert im Serum der Mutter-sau bis zur Geburt war, desto länger persistierten die maternalen Antikörper im Ferkelserum.

Im Wurf 1 waren sie sieben Wochen, im Wurf 2 zwei Wochen, im Wurf 3 eine Woche und im Wurf 4 drei Tage post partum nachweisbar. Ein Nettoextinktionswert über 0 fand sich im Kolostrum der Sau Nr. 1 zum letztenmal nach 12 Stunden, bei der Sau Nr. 2 nach 72 Stunden, bei der Sau Nr. 3 nach 1 Stunde

Tabelle 3 Ueberblick über den Ablauf des Infektionsversuches bei der
Muttersau Nr. 1 und deren Wurf

Datum	Muttersau Nr. 1		Ferkel Nr. 101 - 109	
	Husten	Bemerkungen	Husten	Bemerkungen
1. 7.		experimentelle Infektion		
20. 7.	++	Körpertemperatur und Appetit normal		
19. 7.	+++			
2. 9.		Geburt		9 Ferkel lebend geboren
15. 9.			+	
28. 9.			+	101,104,107,109: Nasentupfer: keine B.bronchiseptica, aber + bis +++ Fremdkeime
30. 9.			++	
8.10.			+++	
14.10.			+++	
25.10.		Schlachtung:Lunge ohne makroskopisch erkennbare Läsionen		Absetzen
28.10.			++	
25.11.			++	
9.12.			+	
14. 3.				101,103,104,105,106, 108:Schlachtung: Lunge ohne makroskopische erkennbare Läsionen. 109:Schlachtung:Narbige Einziehung am Spitzlappen rechts. Histologisch starker Verdacht auf chron. EP.
2. 5.				102,107:Schlachtung: Lungen ohne makroskopisch erkennbare Läsionen.

Tabelle 4 Ueberblick über den Ablauf des Infektionsversuches bei der
Muttersau Nr. 2 und deren Wurf

Datum	Muttersau Nr. 2		Ferkel Nr. 201 - 208	
	Husten	Bemerkungen	Husten	Bemerkungen
1. 7.		experimentelle Infektion		
19. 7.	++	Körpertemperatur und Appetit normal		
18. 8.	+			
1. 9.	++	Geburt		10 Ferkel geboren (1 tot, 1 lebens- schwach)
2. 9.	++			
5. 9.	++			
15. 9.			+	
28. 9.			+	201, 204, 205, 206: Nasentupfer: keine B.bronchiseptica, aber + bis +++Fremdkeime
30. 9.			+++	
14.10.			+++	
25.10.		Schlachtung: Narbige Einziehung an Herz- lappen rechts. Histologisch starker Verdacht auf chronische EP		Absetzen
25.11.			++	
14. 3.				201,202,203,204,205,206: Schlachtung: alle Lungen ohne makroskopisch er- kennbare Läsionen

Tabelle 5 Ueberblick über den Ablauf des Infektionsversuches bei der
Muttersau Nr. 3 und deren Wurf

Datum	Muttersau Nr. 3		Ferkel Nr. 301 - 313	
	Husten	Bemerkungen	Husten	Bemerkungen
1. 7.		experimentelle Infektion		
21. 7.	++	Körpertemperatur 39.8° Appetit normal		
22. 7.	+++	Körpertemperatur normal		
12. 8.	+++			
1.10		Geburt		13 lebende Ferkel geboren, 311: erdrückt
21.10			+	
31.10.			+	301 und 306 als Kümmerer aus Versuch ausgeschieden
27.11.		Schlachtung: Lunge ohne makroskopisch erkennbare Läsionen	++	Absetzen
6. 1.			++	
2. 5.				302,303,304,305,307,308, 309,310,312,313: Schlachtung: alle Lungen ohne makroskopisch erkennbare Läsionen

Tabelle 6 Ueberblick über den Ablauf des Infektionsversuches bei der
Muttersau Nr. 4 und deren Wurf

Datum	Muttersau Nr. 4		Ferkel Nr. 401 - 406	
	Husten	Bemerkungen	Husten	Bemerkungen
1. 7.		experimentelle Infektion		
19. 7.	++	Körpertemperatur und Appetit normal		
11. 8.	++			
7. 9.		Geburt		10 Ferkel geboren (4 tot, 1 davon mumifiziert)
28. 9.				401, 403, 404, 405: Nasentupfer: keine B.bronchiseptica, aber + bis +++ Fremdkeime
4. 10.				405: erdrückt, Lunge ohne Anzeichen von EP
21. 10.			+	
25. 10.		Schlachtung: Lunge ohne makroskopisch erkennbare Läsionen		Absetzen
28. 10.			++	
25. 11.			++	
14. 3.				401, 402, 403, 404, 406: Schlachtung: alle Lungen ohne makroskopisch er- kennbare Läsionen

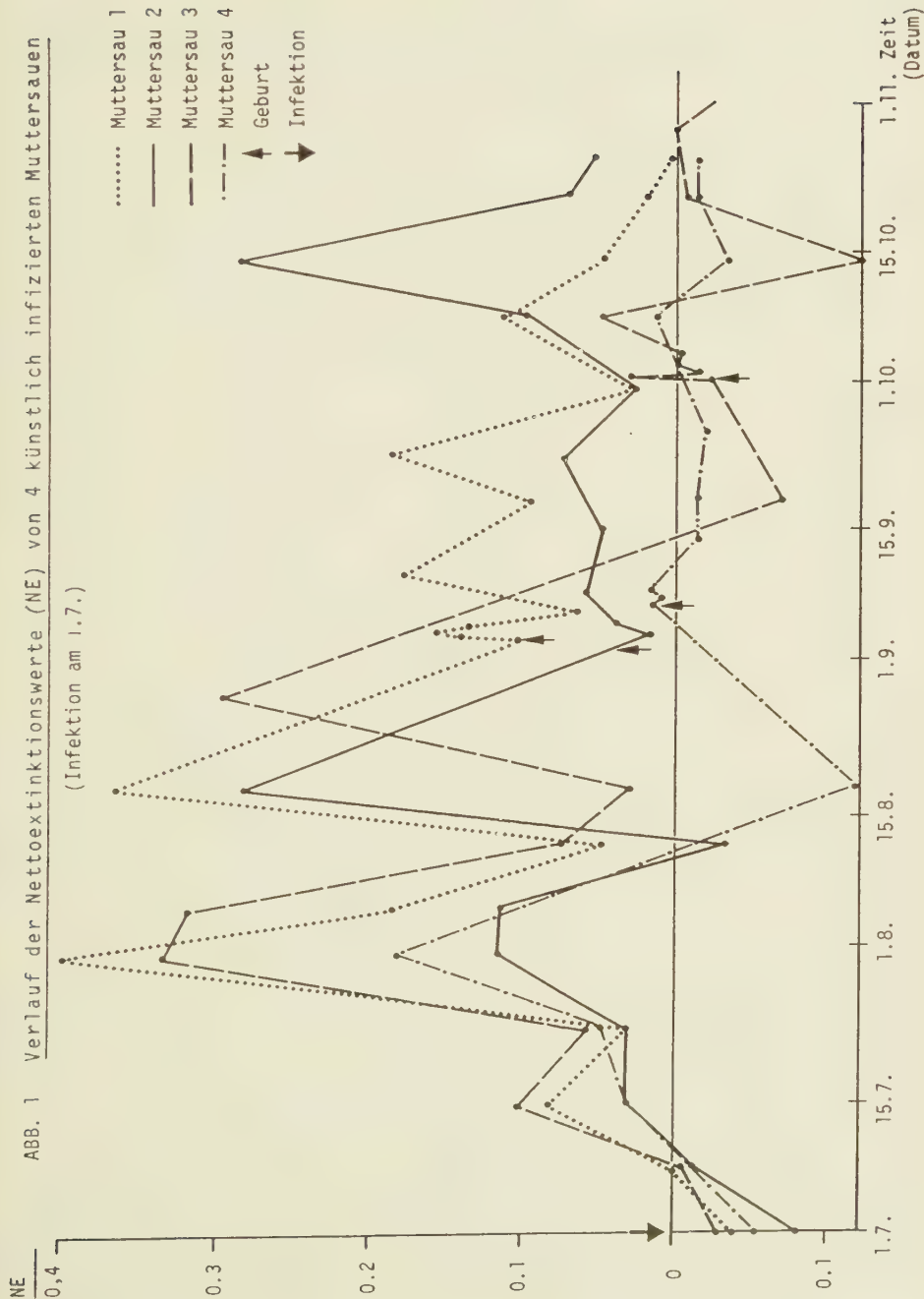
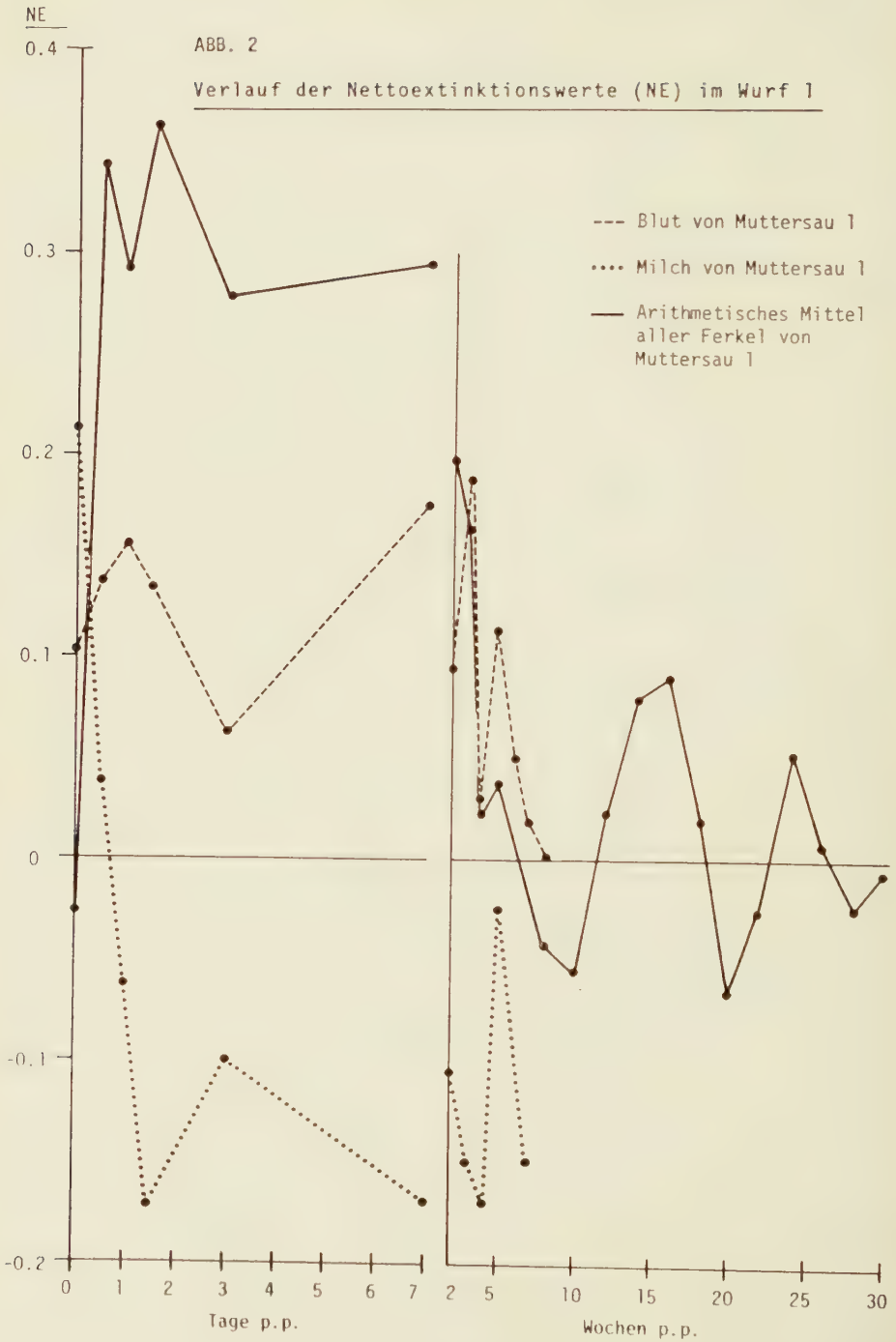


ABB. 2

Verlauf der Nettoextinktionswerte (NE) im Wurf 1



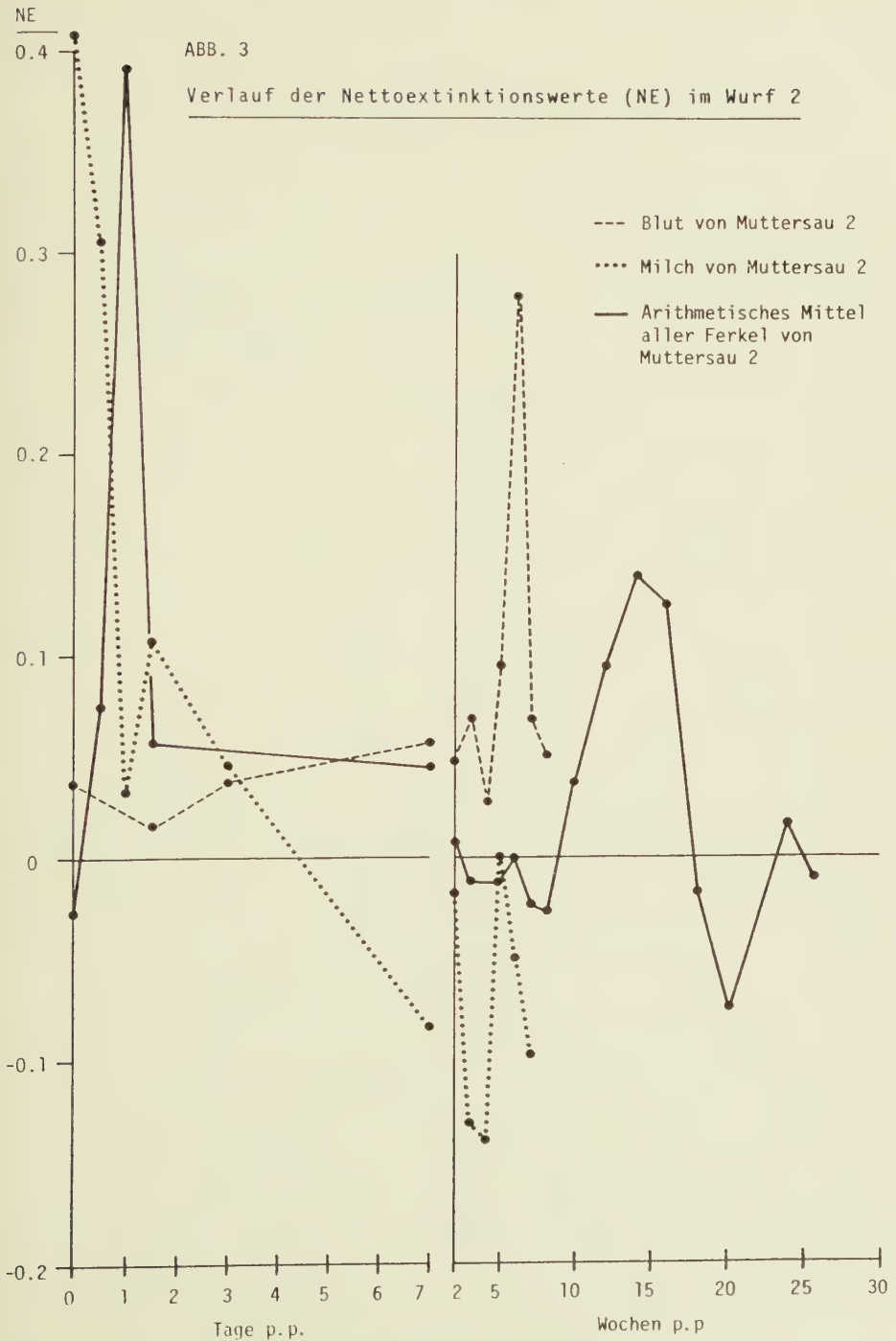


ABB. 4

Verlauf der Nettoextinktionswerte (NE) im Wurf 3

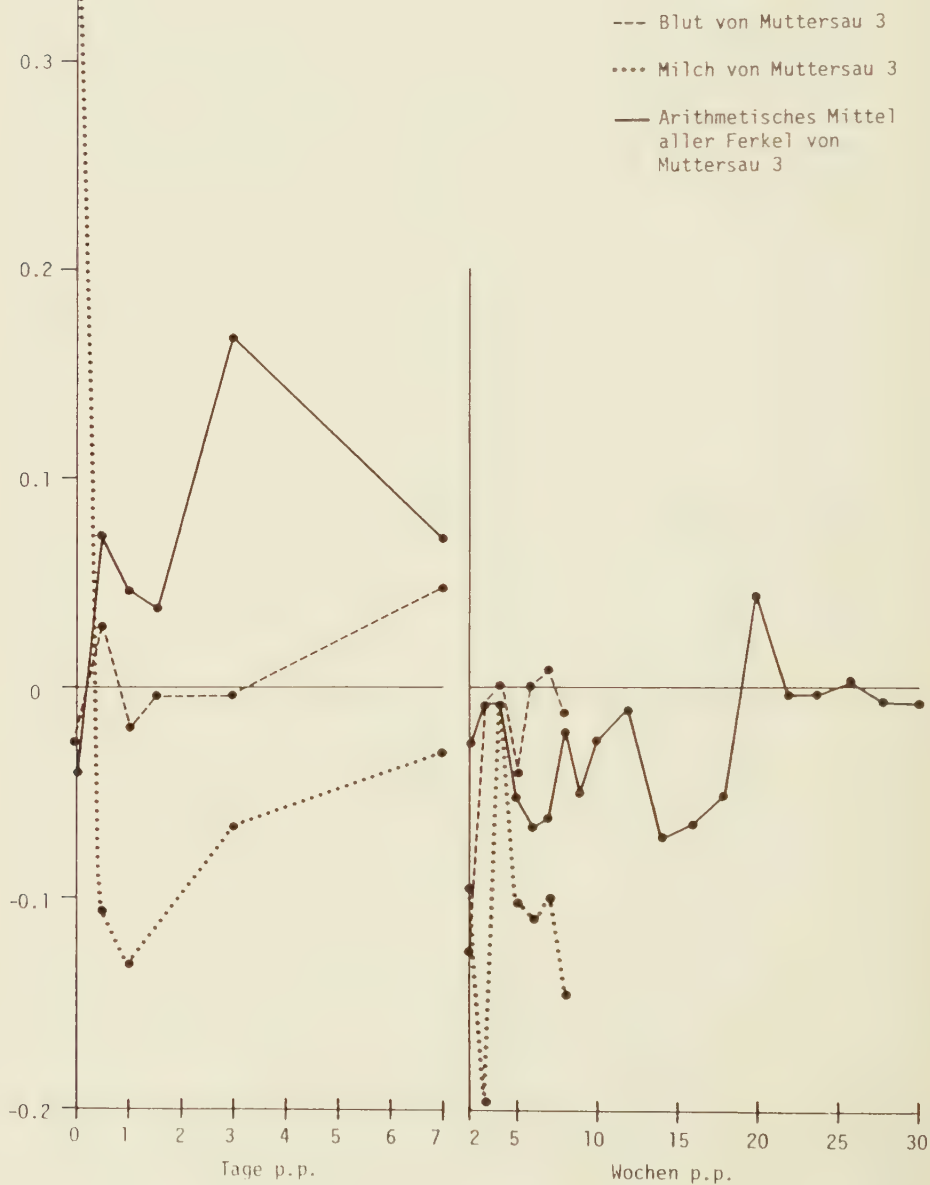
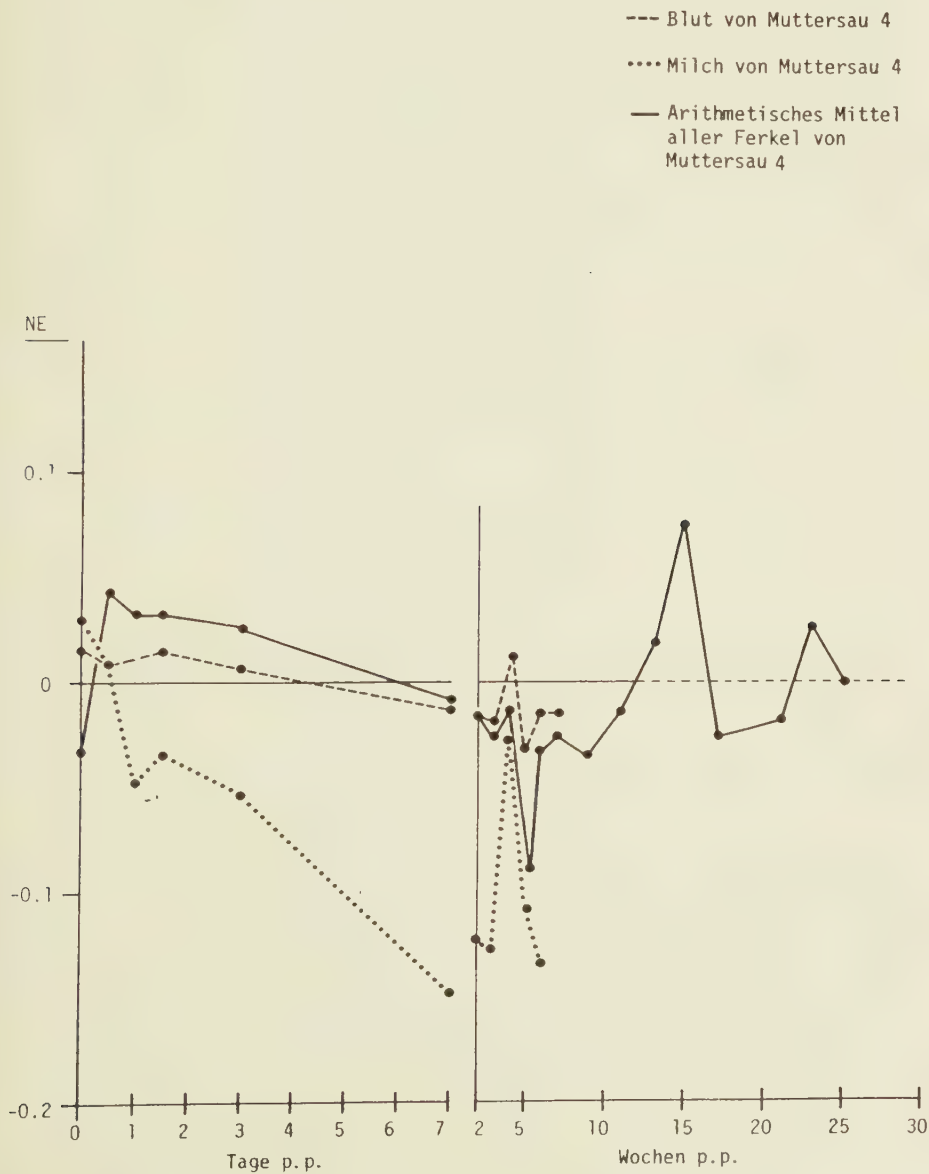


ABB. 5

Verlauf der Nettoextinktionswerte (NE) im Wurf 4



und bei der Sau Nr. 4 nach 12 Stunden. Ein Peak mit positiven Reaktionen erscheint bei allen 4 Würfen nach vermutlich natürlicher Immunisierung im Alter von 10 (Wurf 2) bis 20 Wochen (Wurf 3).

Zum Zeitpunkt der Schlachtung (Alter 180 - 210 Tage), wies indessen kein Tier mehr eine positive ELISA-Reaktion auf.

Bei der Schlachtung lagen einzig an der Lunge der Sau Nr. 2 (mit fraglich positiver Reaktion) und dem Schwein Nr. 109 noch makroskopisch erkennbare Veränderungen vor, die sich auch anhand einer histologischen Untersuchung als EP-verdächtig einstufen liessen. Die Lungen der restlichen Versuchstiere waren makroskopisch unverändert.

3.3. Serologische Querschnittsuntersuchungen

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abbildungen 6 bis 11 zusammengestellt.

3.3.1. Kategorie A: (Konventionelle Betriebe mit Husten im Bestand).

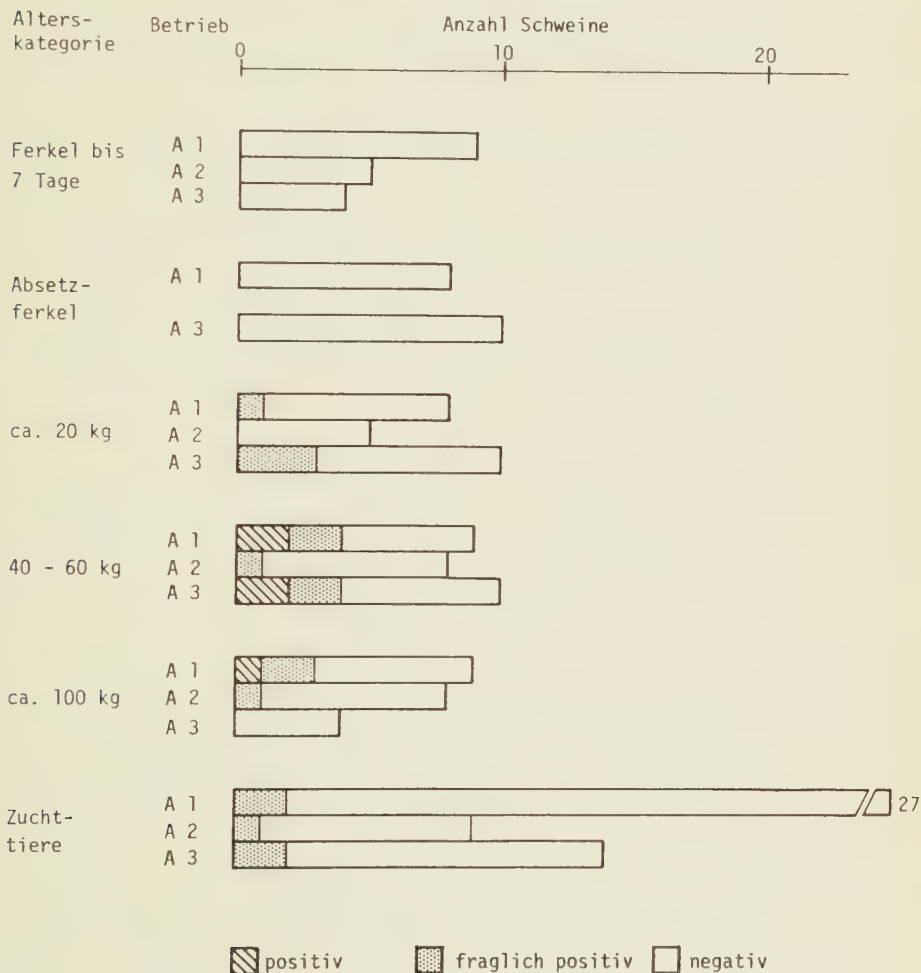
Es fällt auf, dass sich vereinzelt zwar positive Reaktionen nachweisen liessen, aber nur bei Tieren der Gewichtsklasse zwischen 40 und 100 kg. Von den Zuchtsauen reagierte keine positiv. Lediglich 5 von 50 Sauen zeigten fraglich positive Reaktionen.

3.3.2. Kategorie B: (Ehemalige SPF-Herden mit florider EP).

Da aus diesen Betrieben bezüglich des Krankheitsverlaufes exakte Unterlagen vorliegen, lohnt es sich, auf die Ergebnisse im Einzelnen einzutreten.

B1 Das einzige Tier mit einer positiven ELISA-Reaktion ist eine säugende Muttersau mit 11 Tage alten Ferkeln. Zwei dieser Ferkel, die in die Untersuchung einbezogen worden

ABB. 6 Ergebnisse der serologischen Querschnittsuntersuchungen aus den Betrieben der Kat. A



waren, wiesen negative Nettoextinktionswerte auf. Desgleichen ein Eber, der 6 Monate zuvor aus einem EP-reinfigurierten SPF-Betrieb zugekauft worden war. Die deutlichsten klinischen Anzeichen von EP zeigten abgesetzte Ferkel in der Gewichtsklasse von 20 kg. Aus dieser Gruppe wies indessen kein Tier eine positive Reaktion auf.

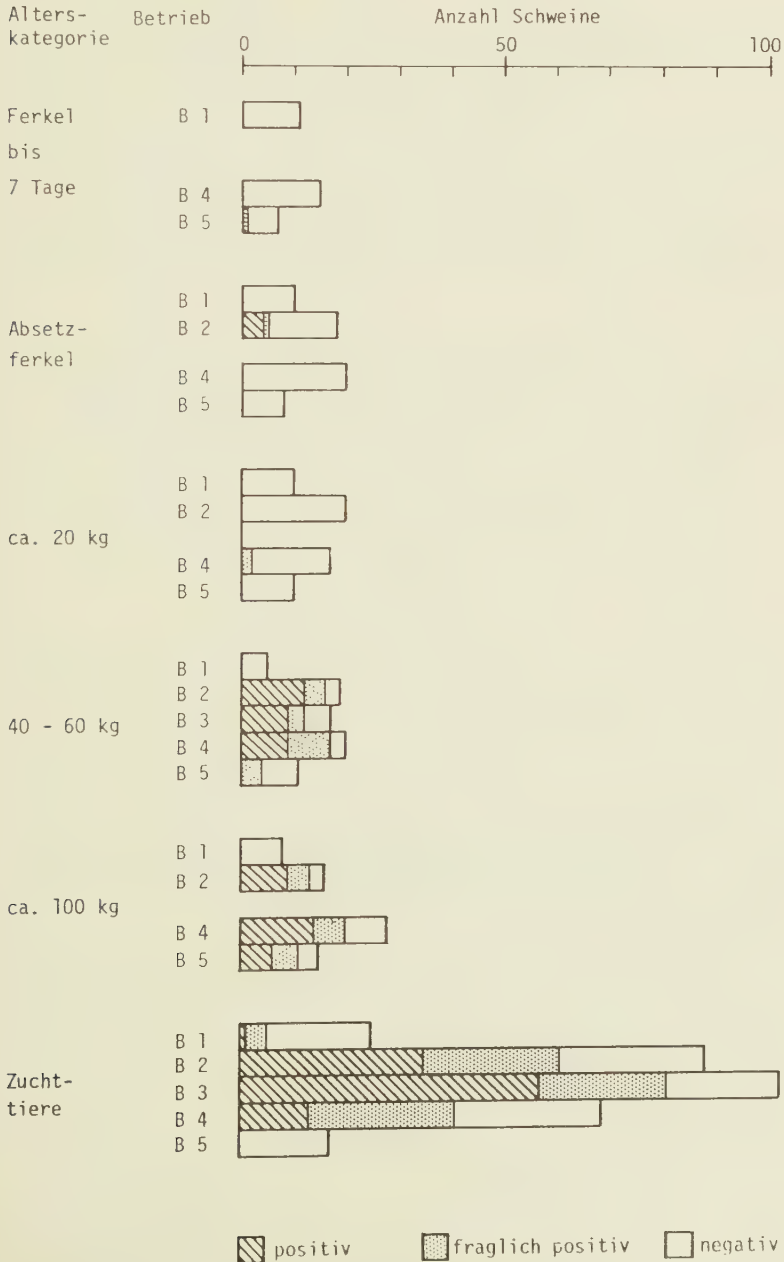
B2 Die Blutentnahmen erfolgten in diesem Betrieb 2 Monate nachdem eine EP-Reinfektion diagnostiziert worden war. Der erste Hustenausbruch war bei Zuchttremonten festgestellt worden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung zeigten nur noch die ca 20 kg schweren Ferkel klinische Anzeichen von EP. Auffallend in diesem Betrieb ist der hohe Prozentsatz der Zuchttiere und älteren Schweine mit positiven Reaktionen, während die hustenden Tiere (noch?) negativ reagierten.

B3 Dieser Betrieb war durch Zukauf von SPF-Primärschweinen aufgebaut worden. Ein halbes Jahr danach brach EP aus. Die Blutentnahmen erfolgten zu einem Zeitpunkt, da Tiere aller Alterskategorien deutlich husteten. Auffallend ist der hohe Prozentsatz positiver Reaktionen.

B4 In diesem Betrieb war 1½ Jahre vor der Blutentnahme EP festgestellt worden. Bewerksenswert ist der hohe Prozentsatz positiver und fraglicher Reaktionen bei allen Schweinen ab 40 kg Lebendgewicht (85% bei jungen und 70% bei älteren Zuchttremonten bzw. rund 60% bei Zuchtsauen).

B5 Verdacht auf EP bestand in diesem Betrieb erstmals 2 Jahre vor der Blutentnahme. (Der mikroskopische Erregernachweis im Ausstrich von Bronchialsekret gelang indessen erst ein Jahr später). Zum Zeitpunkt der Blutuntersuchung husteten die Schweine in den Gewichtskategorien 20, 40 - 60 und 100 kg. Interessanterweise reagierte nur ein Teil der 100 kg schweren Tiere deutlich positiv, während die

ABB. 7 Ergebnisse der serologischen Querschnittsuntersuchungen aus den Betrieben der Kat. B



20 kg schweren Jäger, die ebenfalls husteten, durchwegs negative Reaktionen zeigten.

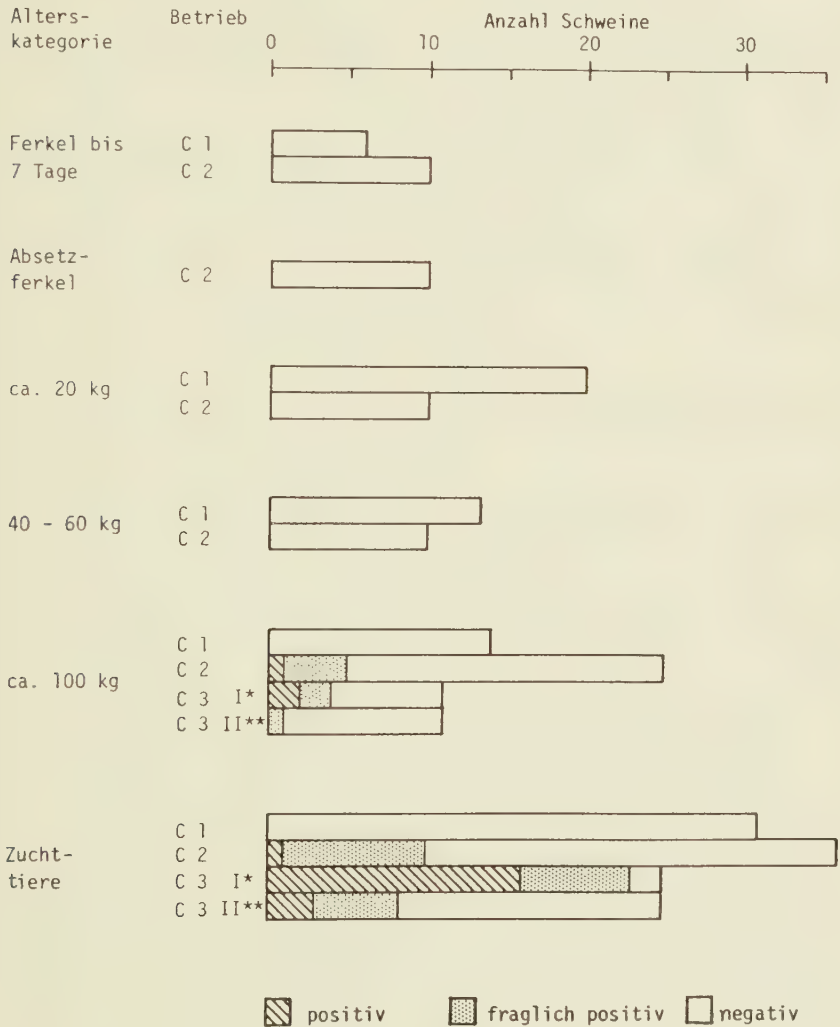
3.3.3. Kategorie C: (EP-reinfizierte SPF-Betriebe mit zum Zeitpunkt der Untersuchung subklinischem Krankheitsverlauf).

C1 Im Betrieb war 4 Jahre vor der Blutentnahme EP diagnostiziert worden. Seither wurden keine Tierzükäufe mehr getätigt. Sämtliche untersuchten Tiere wiesen negative Reaktionen auf.

C2 Eine EP-Reinfektion hatte 3 Jahre vor der Blutentnahme stattgefunden. Nach anfänglich starkem Hustenausbruch bei Tieren aller Alterskategorien verschwanden die klinischen Symptome im Anschluss an einen einmaligen Medizinalfuttereinsatz. Nach erfolgter Reinfektion waren Zukäufe weiterhin nur aus SPF-Betrieben getätigt worden. Auffallend ist der geringe Prozentsatz von Tieren mit positiven Reaktionen.

C3 Aus diesem Betrieb gelangten 6 Monate nach Totalsanierung Schweine zur routinemässigen Schlachtkontrolle. Bei dieser Gelegenheit konnte überraschenderweise EP diagnostiziert werden. Im Bestand selbst lagen keine klinischen Anzeichen dieser Krankheit vor. In Erwartung eines Husten-Ausbruches, der im übrigen auch später nie deutlich erfolgte, wurde 2 und 6 Wochen nach der erwähnten Kontrollschlachtung jeweils bei den gleichen Tieren Blut entnommen. Bei den Zuchttieren zeigten in der ersten Untersuchung 16 von 25 Tieren positive und 7 fraglich positive Reaktionen. Ein Monat später reagierten nur noch 3 Tiere positiv und 5 weitere fraglich positiv. Ein ähnliches Phänomen liess sich bei den 100 kg schweren Schweinen beobachten.

ABB. 8 Ergebnisse der serologischen Querschnittsuntersuchungen aus den Betrieben der Kat. C.



* 1. Blutentnahme (2 Wochen nach Feststellung der EP)

** 2. Blutentnahme (6 Wochen nach Feststellung der EP)

3.3.4. Kategorie D (SPF-Sekundärbetriebe, keine Anhaltspunkte für EP).

Aus den 4 zu dieser Kategorie gehörenden Betrieben stammten insgesamt 322 Proben, davon 111 von Zuchttieren. 17 dieser letztgenannten Seren (15.3%) reagierten fraglich positiv und 2 (1.8%) positiv.

Auf die gesamte Stichprobe entfielen 37 fraglich positive.

In allen Betrieben fanden sich - mit unterschiedlicher Häufigkeit allerdings - fraglich positive Proben. Im Betrieb D3 war es eine Sau, nämlich die Mutter der beiden fraglich positiven Saugferkel.

Alle 4 Betriebe sind jedoch bis heute bezüglich EP unauffällig geblieben.

3.3.5. Kategorie E

Wie aus der Abbildung 10 hervorgeht, reagierten in der Serie PE₁ bei der Untersuchung der ersten zwei Aufzuchtgruppen zunächst 5 Schweine in der Gewichtsklasse von 40 - 60 kg fraglich positiv und 1 positiv. Bei der 2. Untersuchung, ca 4½ Monate später zeigten diese Tiere negative Reaktionen, dafür 3 neue aus der 3. Aufzuchtgruppe fraglich positive.

Die Schweine aus der Serie PE₁ fanden für den Aufbau der SPF-Primärstation E2 Verwendung. Sämtliche hier 11 Monate später gewonnenen 158 Seren wiesen negative Nettoextinktionswerte auf. Im Betrieb zeigten sich bis heute nie Anzeichen von EP.

Mit den Tieren aus der Serie PE₂, in der eine trächtige Jungsau fraglich positiv reagiert hatte, wurden 2 SPF-Primärstationen aufgebaut. In der einen (siehe Betrieb B3) brach EP nach 6 Monaten und in der andern nach ca 12 Monaten aus.

In der Serie PE₃ reagierten 4 von 249 Seren fraglich positiv (Ein Serum stammte von einem ca 20 kg schweren und 3 Seren stammten von ca 100 kg schweren Schweinen). Die beiden mit

ABB. 9 Ergebnisse der serologischen Querschnittsuntersuchungen aus den Betrieben der Kat. D

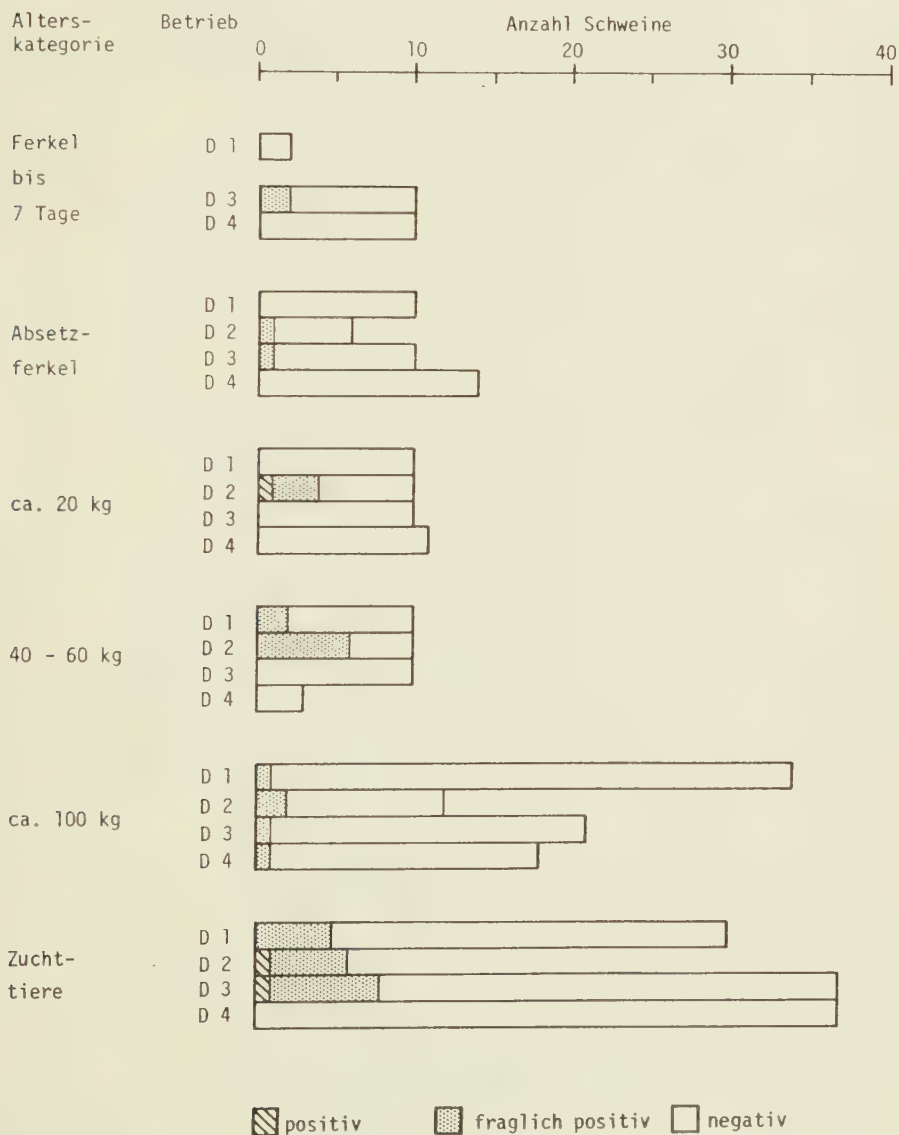
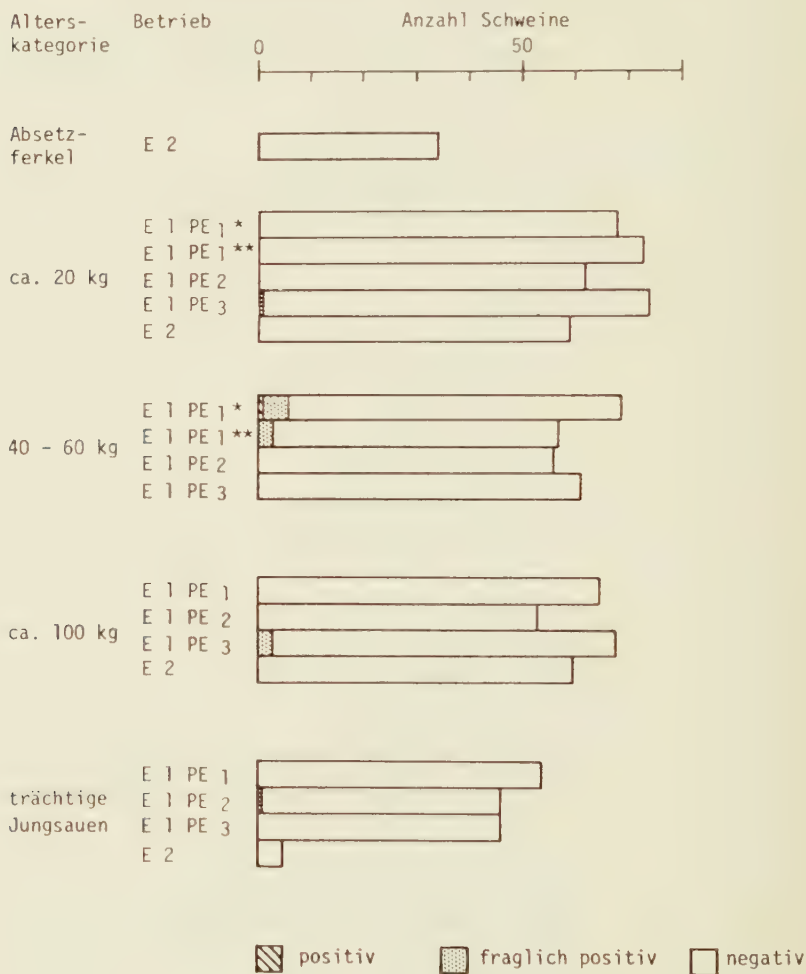


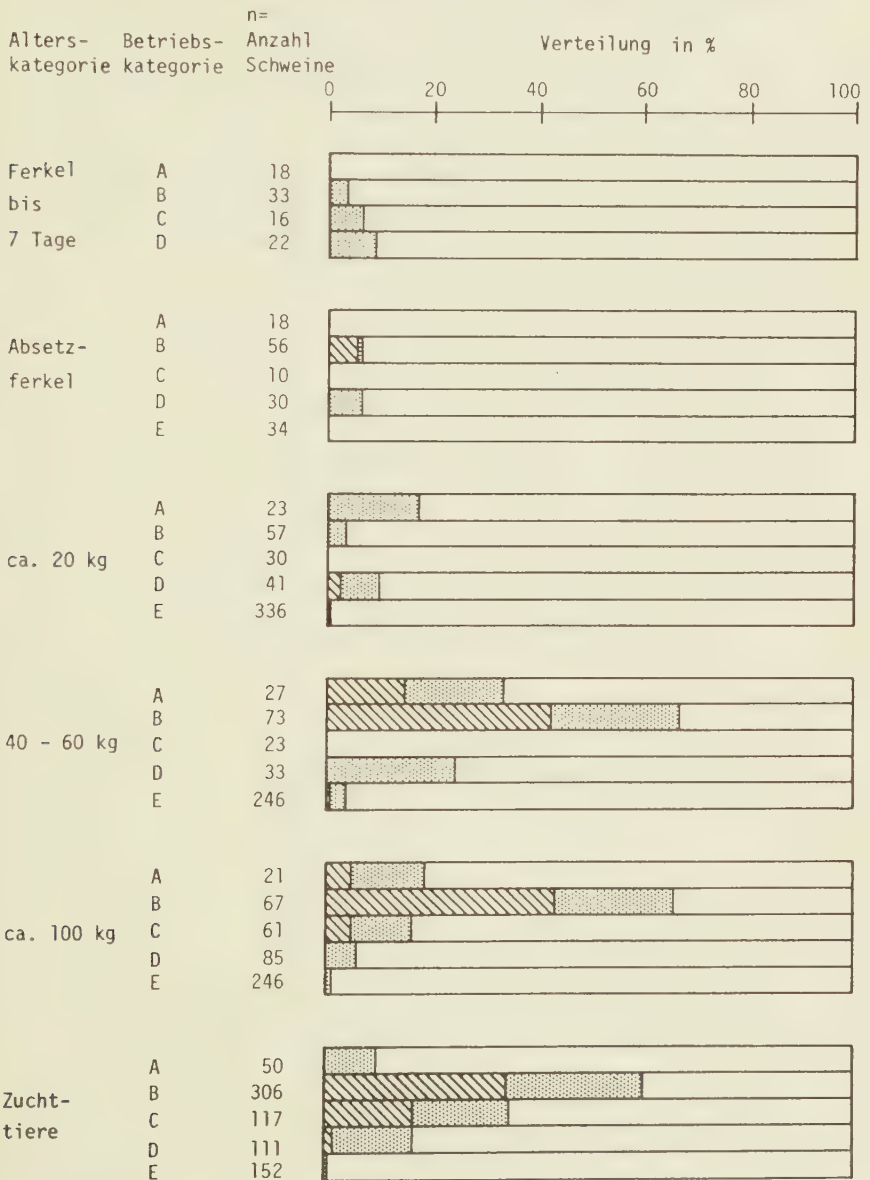
ABB. 10 Ergebnisse der serologischen Querschnittsuntersuchungen
aus den Betrieben der Kat. E



* Untersuch vom 8.3.1978

** Untersuch vom 27.7.1978

ABB. 11 Zusammenfassung der Ergebnisse der serologischen Querschnittsuntersuchungen der Kat. A-E



diesen Tieren aufgebauten SPF-Primärstationen erlitten innert Jahresfrist ebenfalls EP-Reinfektionen.

In Abbildung 11 sind die Resultate der verschiedenen Kategorien zusammengefasst. Es zeigt sich, dass der Prozentsatz der positiven und fraglich positiven Seren in ehemaligen SPF-Betrieben mit florider EP (Kategorie B) am höchsten liegt (ca 49%), und am zweithöchsten in ehemaligen SPF-Betrieben mit subklinischer EP (Kategorie C mit 20%). Zwischen EP-unverdächtigen SPF-Betrieben (12% fragliche und positive Seren) und konventionellen Herden (14%) ergeben sich keine offensichtlichen Unterschiede.

3.4. Korrelationsuntersuchungen

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 12 dargestellt. Ein einheitliches Bild ist nicht erkennbar.

Im Mastbetrieb K1 (chronische EP) z.B. wiesen 41 von 50 Tieren postive oder fraglich positive Titer auf. 7 der 8 Schweine mit makroskopisch erkennbaren Lungenläsionen erwiesen sich als positiv oder fraglich positiv. Im ebenfalls chronisch infizierten Mastbetrieb K4 dagegen lagen bei 12 von 18 Schweinen negative Nettoextinktionswerte vor. Selbst von den 8 Tieren mit persistierenden Lungenläsionen reagierten 6 negativ.

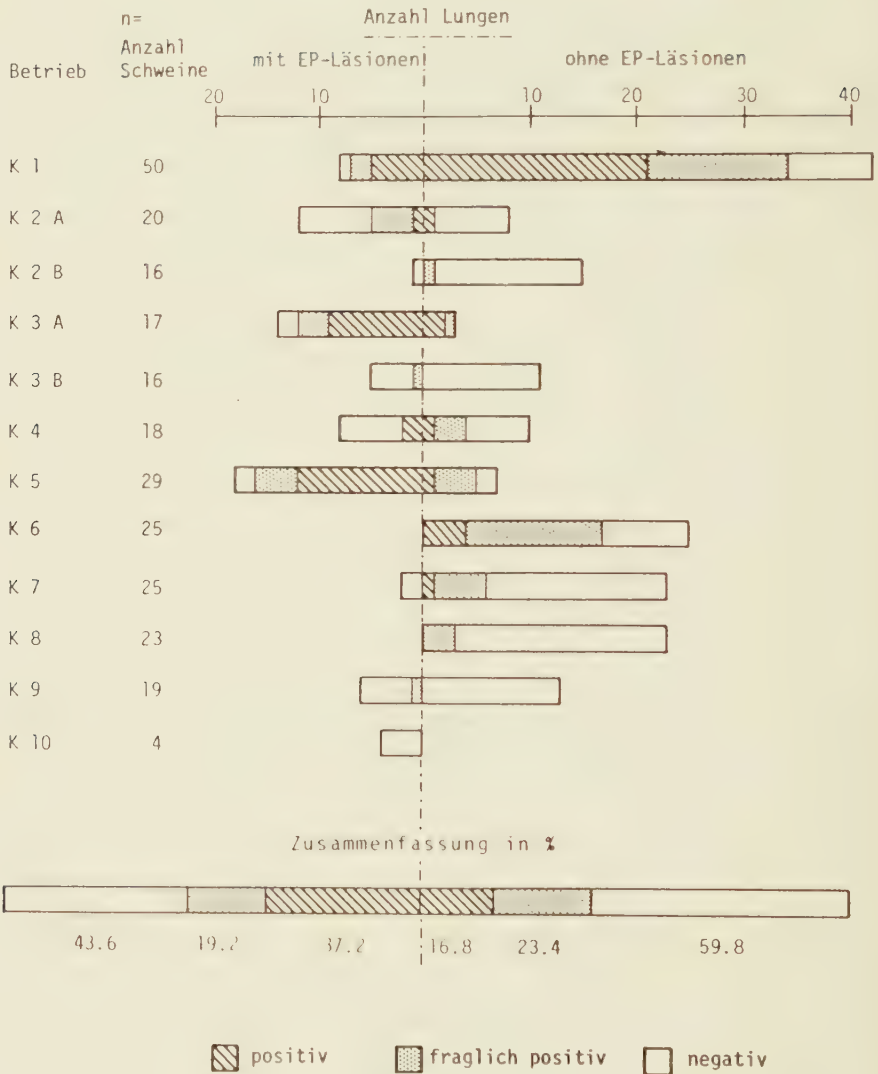
Aus den 6 Mastbetrieben mit chronischer EP (K1 bis K5 und K7) fielen Tiere an, die (noch) makroskopische Lungenläsionen zeigten. Insgesamt waren es 68 (= 35.6%). In jedem dieser Betriebe fanden sich Tiere, die trotzdem eine negative ELISA-Reaktion aufwiesen. Der Prozentsatz schwankte zwar von Betrieb zu Betrieb, betrug im Durchschnitt jedoch 36.8%.

Die 4 Schweine aus dem Betrieb K10 - alle mit negativen Titern - waren akut an EP erkrankt, desgleichen die Tiere aus dem Bestand K9. Hier war nur ein fraglich positives Tier ermittelt worden.

Ein variables Bild ergab sich auch bezüglich der seropositiven Tiere ohne makroskopischen Lungenbefund. Im Betrieb K1 reagierten 34 von insgesamt 42 Tieren dieser Kategorie entweder positiv oder fraglich positiv. Im Bestand K2 waren es nur 2 von 23.

ABB. 12

Korrelationsuntersuchungen



4. Diskussion

Wie in der Einleitung erwähnt, existiert bezüglich der Erfassung subklinisch verlaufender M.hypopneumoniae-Infektionen eine für die Praxis schwerwiegende Diagnostiklücke. Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob diese mittels ELISA und unter Verwendung bestimmter Membran-Proteine von M.hypopneumoniae zu schliessen sei. Im Vordergrund stand die Blutserologie, doch wurden auch milchserologische Untersuchungen durchgeführt.

Was die Blutserologie anbetrifft, zeigen die Versuchsergebnisse, dass der zur Anwendung gebrachte Test nicht praxistauglich ist. Wo liegen die Gründe? Lässt die Spezifität des Antigens zu wünschen übrig, fehlt es an einer guten Reproduzierbarkeit des Tests oder sind andere Ursachen ausschlaggebend?

1976 wurde von Bruggmann et al. die ELISA-Technik erstmals zum Nachweis von Antikörpern gegen M.hypopneumoniae eingesetzt. Die ersten Feldversuche liessen Zweifel an einer ausreichenden Spezifität des damals verwendeten Antigens aufkommen (Keller und Bruggmann, 1977 und 1978). Wie sich in der Folge herausstellte, bestanden diese Bedenken zu recht. Kreuzreaktionen mit M.hyorhinis und insbesondere mit M.flocculare wurden nachgewiesen (Armstrong et al., 1980). Ferner liess sich aufzeigen, dass Bestandteile der Nährmedien unspezifische Reaktionen auslösen können (Nicolet et al. 1980).

Zur Beantwortung der Frage, wie spezifisch die von uns verwendete, neue Antigenpräparation war, müssen die Ergebnisse der serologischen Querschnittsuntersuchungen in den Betrieben der Kategorie E (SPF-Primärbetriebe) herangezogen werden. Hier hätte man ausschliesslich negative ELISA-Reaktionen erwartet. Von insgesamt 1014 Seren, die bei SPF-Primärtieren entnommen worden waren, reagierten 13 (1.2%) fraglich positiv und ein Serum positiv. Eine Interpretation dieser Befunde ist indessen schwierig. Die in der Serie PE₁

untersuchten Tiere (mit 5 fraglich positiven und 1 positiven Serum) wurden für den Aufbau der SPF-Primärherde E2 verwendet. Aus der serologischen Querschnittsuntersuchung dieses Betriebes fielen später ausschliesslich negative Seren an und der Bestand ist bis heute bezüglich EP unauffällig geblieben. Mit den Tieren der Aufzuchtserien PE₂ und PE₃ , die nur vereinzelt fraglich positive Reaktionen aufgewiesen hatten, waren jedoch SPF-Primärherden aufgebaut worden, die nach relativ kurzer Zeit (6 - 12 Monate) - aus unbekannten Gründen - an EP niedergebrochen sind (u.a. der Betrieb B3). Es erscheint indessen trotzdem unwahrscheinlich, dass die unerwarteten blutserologischen Befunde der Kategorie E etwas zu tun hatten mit einer M.hyopneumoniae-Infektion. Die übrigen im Rahmen dieser Untersuchung erzielten Ergebnisse lassen nämlich den Schluss zu, subklinisch verlaufende Infektionen mit M.hyopneumoniae seien mit der zur Anwendung gebrachten Methode gar nicht erfassbar (siehe weiter unten). An akuter oder subakuter EP waren aber die Schweine aus den verschiedenen Aufzuchtserien zum Zeitpunkt der Blutentnahme zweifellos nicht erkrankt.

Die Frage, ob die unklaren Reaktionen auf Kreuzreaktionen mit M.flocculare zurückzuführen sind, muss ebenfalls offen bleiben, weil allgemein wenig bekannt ist über die Verbreitung dieses Keimes in der hiesigen Schweinepopulation.

Eine andere, nicht unplausible Erklärung könnte aus der wiederholt gemachten Beobachtung abgeleitet werden, dass die gemessenen Extinktionswerte bei Doppelbestimmungen zuweilen beachtliche Abweichungen erkennen liessen, selbst dann, wenn die Seren auf die gleiche Platte aufgetragen worden waren. Die Ursachen dieses Phänomens sind nicht genau bekannt. Möglicherweise erfolgte eine ungleichmässige Absorption des Antigens in den verschiedenen Dellen. Unterschiede könnten auch von Unregelmässigkeiten beim Auswaschen herrühren. Letzteres erscheint aber wiederum unwahrscheinlich, weil dieser Arbeitsgang automatisiert ablief. Erfolgten Nachuntersuchungen der gleichen Seren zu einem späteren Zeit-

punkt, so könnten Unterschiede an den Testplatten, am Konjugat sowie bei der Raumtemperatur die Ergebnisse beeinflussen haben.

Möglicherweise hatte auch das Auftauen und Einfrieren der Seren eine Auswirkung auf die Messresultate.

Dem Umstand, dass der Test wegen einer Reihe potentieller Störfaktoren nicht einfach standardisierbar ist, wurde allerdings durch ein besonderes Verfahren zur Bestimmung der Nettoextinktionswerte Rechnung getragen. Inwieweit allfällige Fehler damit eliminiert werden konnten, ist indessen unbekannt.

Allein, weder die "unspezifischen" Reaktionen, noch die Schwierigkeiten bei der Standardisierung des ELISA stellen den Hauptmangel des von uns erprobten Testverfahren dar. Dieser liegt vielmehr darin, dass sich positive Reaktionen nur während relativ kurzer Zeit nachweisen liessen.

Im Infektionsversuch zeigten die infizierten Muttersauen zwar bereits 2 Wochen post infectionem Serokonversion. Resultate aus den Korrelationsuntersuchungen lassen es jedoch als fraglich erscheinen, dass regelmässig innert so kurzer Zeit mit dem Auftreten positiver ELISA-Reaktionen gerechnet werden kann. Die akut an EP erkrankten Tiere aus dem Mastbetrieb K10 wiesen jedenfalls durchwegs negative Nettoextinktionswerte auf, und aus dem Betrieb K9 reagierte nur eines der 6 akut erkrankten Tiere fraglich positiv.

Die Infektionsversuche, die serologischen Querschnittsuntersuchungen sowie die Korrelationsuntersuchungen zeigen, dass positive Reaktionen nur während kurzer Zeit beobachtet werden können. Die experimentell infizierten Muttersauen reagierten nur während 1 - 4 Monaten positiv und ihre natürlich infizierten Nachkommen lediglich während 2 - 3 Monaten.

Bei den Korrelationsuntersuchungen fällt auf, dass in chronisch infizierten Mastbetrieben selbst 44% der Tiere mit persistierenden EP-Läsionen negative Reaktionen aufwiesen. In gleichartigen Versuchen hatten Hodges und Betts (1969)

mittels KBR 19%, Lam und Switzer mittels IHA 22% und Holmgren (1973) (ebenfalls mittels IHA) 11% "falsch negative" Seren ermittelt. Bei Schweinen mit makroskopisch unveränderten Lungen betrug in unseren Untersuchungen der Prozentsatz der seronegativen Tiere 60% (Hodges und Betts (1969): 69%. Lam and Switzer (1971): 78%).

Bertschinger et al.(1972) fanden, dass unter günstigen Umweltbedingungen makroskopisch erkennbare EP-Läsionen innert 2 Monaten abheilen können, während histologische Veränderungen weit länger persistieren. Obschon sämtliche in unsern Infektionsversuchen verwendeten Schweine eine zeitlang deutliche klinische Anzeichen von EP gezeigt hatten, waren ihre Lungen mit 2 Ausnahmen (eine Muttersau und ein Mastschwein) anlässlich der Schlachtung frei von makroskopisch erkennbaren Läsionen.

Whittlestone (1957) sowie Keller und Bertschinger (1968) haben übereinstimmend festgestellt, dass die Zahl der in Lungenabklatsch-Präparaten nachweisbaren EP-Erreger mit beginnender Abheilung der EP-Läsionen stark abnimmt. Aus älteren EP-Läsionen lässt sich daher mit dieser Methode i.d.R. kein EP-Erreger mehr nachweisen. Der rasche Wegfall der positiven ELISA Reaktionen könnte mit diesem Phänomen zusammenhängen: Mit sinkender Erregerzahl vermindert sich der antigene Stimulus. Trifft diese Interpretation zu, so würde das bedeuten, dass sich mit Hilfe unseres Testverfahrens nur die akute und subakute Phase der EP erfassen lässt.

Die Resultate sowohl der Infektionsversuche als auch der serologischen Querschnittsuntersuchungen scheinen diese These zu stützen.

In den frisch EP reinfizierten ehemaligen SPF-Betrieben B2 und B3 war der hohe Prozentsatz positiver Seren von Zuchttieren auffällig. Im Betrieb B2 war die Reinfektion 2 Monate vor der Blutentnahme festgestellt worden. Erste klinische Anzeichen hatten Zuchttremonten gezeigt. Im Betrieb B3 erfolgten die Blutentnahmen bereits 7 Tage nach erfolgtem

Hustenausbruch. Zu diesem Zeitpunkt zeigten von den Absetzferkeln an aufwärts Tiere aller Alterskategorien klinische Symptome. Im Gegensatz zu diesen frisch infizierten Betrieben liessen sich bei Muttersauen aus konventionellen Betrieben (Kategorie A) keine positiven Reaktionen nachweisen. Lediglich 10% der Sauen reagierten fraglich positiv. Sero-positive Tiere fanden sich nur in der Gewichtskategorie zwischen 40 und 100 kg. Bemerkenswert ist auch das Geschehen im Betrieb C3, wo nach einem EP-Ausbruch bei den gleichen Tieren im Abstand eines Monats Blutproben entnommen worden waren. Innert dieser Frist verschwanden bei 13 von 16 Zucht-tieren die positiven Reaktionen.

Gestützt auf die hier zitierten Ergebnisse kommen wir zum Schluss, die in unseren Versuchen zur Anwendung gebrachte blutserologische Methode sei nicht in der Lage, zur Lösung des eingangs erwähnten Diagnostikproblems beizutragen.

Abschliessend sei aber darauf hingewiesen, dass die milchserologischen Untersuchungen - obschon auf schmaler Basis vorgenommen - möglicherweise einen neuen und für die Praxis gangbaren Weg aufgezeigt haben. Der Umstand, dass die Netto-extinktionswerte im Kolostrum 2 - 10 mal höher liegen als im Serum, erlaubt den Nachweis kleinerer Antikörpermengen. Am aussagekräftigsten wäre dabei eine unter der Geburt entnommene Milchprobe. Erfreulicherweise wurde in der Folge die systematische Erforschung der Milchserologie von den Berner Kollegen an die Hand genommen (Zimmermann et al, 1986).

5. Zusammenfassung

Es wurde untersucht, inwieweit sich im ELISA bestimmte M.hyopneumoniae-Membranproteine als Antigen zum blut- und milchserologischen Nachweis von M.hyopneumoniae-Antikörpern eignen. An einer Versuchstiergruppe, bestehend aus 4 experimentell mit M.hyopneumoniae infizierten Muttersauen und deren natürlich infizierten Nachkommen wurde der Verlauf der Reaktion zeitlich verfolgt. Eine Serokonversion fand z.T. schon 2 Wochen post infectionem statt, aber positive Reaktionen liessen sich nur während der Dauer von 1 - 4 Monaten beobachten. Im Kolostrum konnten 2 - 10fach höhere Extinktionswerte gemessen werden als im Serum.

Der Test wurde ferner geprüft anhand von serologischen Querschnittsuntersuchungen in 17 Zuchtbetrieben mit unterschiedlichem Status bezüglich der Enzootischen Pneumonie (EP).

Es zeigte sich, dass der Anteil seropositiver Schweine in Beständen mit florider EP am höchsten lag (ca. 50%). Der Prozentsatz positiver und fraglich positiver Seren war in EP-unverdächtigen SPF-Herden annähernd gleich gross wie in Beständen mit chronischer EP.

Durch Untersuchungen an Schlachtschweinen aus EP-verseuchten Beständen wurde abgeklärt, inwieweit Lungenbefunde und ELISA-Reaktionen korrelieren. Schweine mit persistierenden Lungenläsionen reagierten in 35% der Fälle negativ.

Die erzielten Resultate lassen den Schluss zu, dass sich der Test, der im übrigen nicht leicht standardisierbar ist, für blutserologische Untersuchungen im Rahmen eines Herdenüberwachungsprogrammes nicht eignet.

6. Literaturverzeichnis

- Armstrong, C.H., Freeman, M.J., Lopez-Osuna, M., Runnels, L.J., Sands, L.L. (1980): Mycoplasmal pneumonia of swine: A comparison of the enzyme linked immunosorbent assay, indirect hemagglutination, indirect immunofluorescence and complement fixation as immunodiagnostic tools. Proc. 6th Congress of the International Pig Veterinary Society, Copenhagen, 1980.
- Bertschinger, H.U., Keller, H., Löhner, A. und Wegmann, W. (1972): Der zeitliche Verlauf der experimentellen enzootischen Pneumonie beim SPF-Schwein. Schweiz. Arch. Tierheilk. 114, 107 - 116.
- Bruggmann, St., Keller, H., Bertschinger, H.U. and Engberg, B. (1977): Quantitative detection of antibodies to Mycoplasma suis pneumoniae in pig's sera by an enzyme linked immunosorbent assay. Vet Rec. 101, 109 - 111.
- Engvall, E. and Perlmann, P. (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunology 109, 129 - 135.
- Goodwin, R.F.W., Hodgson, R.G., Whittlestone, P. and Woodhams, R.L. (1969): Immunity in experimentally induced enzootic pneumonia of pigs. J. Hyg. Camb. 67, 193 - 208.
- Goodwin, R.F.W. (1984): Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: Early signs and incubation period. Vet. Rec. 115, 320 - 324.

- Hodges, R.T. and Betts, A.O. (1969): Complement-fixation tests in the diagnosis of enzootic pneumonia of pigs. II. Field studies. Vet. Rec. 85, 455 - 458.
- Holmgren, W. (1973): An indirect hemagglutination test for detection of antibodies against Mycoplasma hyopneumoniae using formalinized tanned swine erythrocytes. Acta vet. scand. 14, 353 - 355.
- Keller, H. (1973): 10 Jahre Herdensanierung mit Spezifisch-Pathogen-Freien (SPF)-Schweinen. Habil.Schr., Zürich
- Keller, H. (1980): Aktuelle Probleme des schweizerischen SPF-Programmes. Dtsch. tierärztl. Wschr. 87, 449 - 451.
- Keller, H. und Bertschinger, H.U. (1968): Der Nachweis pleomorpher Organismen (PO) in der Diagnostik der enzootischen Pneumonie des Schweines. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 81, 101 - 107.
- Keller H. und Bruggmann, St. (1977): Zum Stand des EP-Serologie-Forschungsprogrammes. Der Kleinviehzüchter 25, 473 - 474.
- Keller, H. und Bruggmann, St. (1978): Ergebnisse der serologischen Untersuchungen (ELISA) in Remontierungsbetrieben. Der Kleinviehzüchter 26, 355 - 356.
- Koch, W. (1980): Kolostrumfreie Aufzucht von Hysterektomieferkeln. Schweiz. Arch. Tierheilk. 122, 127 - 136.
- Lam, K.M. and Switzer, W.P. (1972): Mycoplasmal pneumonia of swine: Serological response in pigs. Amer. J. Vet. Res. 33, 1329 - 1332.

- L'Ecuyer, C. and Boulanger, P. (1970): Enzootic pneumonia of pigs: Identification of a causative *Mycoplasma* in infected pigs and in cultures by immunofluorescent staining. *Canad. J. comp. Med.* 34, 38 - 64.
- Nicolet, J., Bruggmann, St. and Paroz, Ph. (1980): Serological investigations on enzootic pneumonia with an enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA). *Proc. 6th Congress of the International Pig Veterinary Society*, S.225, Copenhagen.
- Nicolet, J., Paroz, P. and Bruggmann, St. (1980): Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res.Vet.Sci.* 29, 305 - 309.
- Roberts, D.H. (1968): Serological diagnosis of *Mycoplasma-hyopneumoniae* infection in pigs. *Vet. Rec.* 82 362 - 363.
- Whittlestone, P. (1958): Enzootic pneumonia of pigs and related conditions. Thesis, Cambridge.
- Zimmermann, W., Tschudi, P. und Nicolet, J. (1986): ELISA-Serologie in Blut und Kolostralmilch: Eine Möglichkeit zur Ueberwachung der enzootischen Pneumonie (EP) in Schweinebeständen. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 128, 299 - 306.

Curriculum vitae

Am 25. Mai 1950 wurde ich als Sohn von Anton und Marie Eberli-Iten in Altwis LU geboren. Am Geburtsort besuchte ich die Primarschule und am Kollegium in Stans das Gymnasium, wo ich 1970 die Matura Typus A bestand.

Das Studium der Veterinärmedizin nahm ich 1970 an der Veterinär-medizinischen Fakultät der Univesität Bern auf und beendete es 1975 an der gleichen Fakultät mit dem Staats-examen.

Anschliessend betätigte ich mich bei verschiedenen praktizierenden Tierärzten als Assistent und Stellvertreter. Während 2 Jahren war ich Beratungstierarzt im Schweingesundheitsdienst - Zentrum Zürich. Seit 1979 führe ich eine eigene Gemischtpraxis in Hochdorf LU.

6. Dankesadressen

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Zu besonderem Dank fühle ich mich verpflichtet gegenüber:

- Herrn Prof. Dr. H. Keller, Vet. med. Klinik der Universität Zürich, Abteilung Schweinekrankheiten, und Herrn Prof. Dr. H.U. Berschinger, Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich, für die Ueberlassung des Themas und die jederzeit bereitwillige Beratung und Begutachtung.
- dem Bundesamt für Veterinärwesen, Bern, das mit seiner Unterstützung die Erarbeitung und Durchführung der serologischen Untersuchungen ermöglicht hat.
- dem leider viel zu früh verstorbenen Dr. St. Bruggmann für die Entwicklung der serologischen Methode und Frau B. Engberg für die Durchführung der Labor-Untersuchungen.
- Herrn Prof. Dr. J. Nicolet, Veterinärbakteriologisches Institut der Universität Bern, für die Ueberlassung von Kontrollseren und Antigenmaterial.
- Herrn Prof. Dr. R. Wyler, Institut für Virologie der Universität Zürich, für die Zuverfügungstellung eines Spektralphotometers.
- Frau Dr. E. Bürgi, Vet. med. Klinik der Universität Zürich, Abteilung Schweinekrankheiten, und Herrn Dr. W. Koch, Hohenrain, für ihr Interesse an der Arbeit und ihre wertvollen Anregungen.

- meiner lieben Frau Doris und den Schweinehaltern für die tatkräftige Mithilfe bei den Blutentnahmen, meinen Eltern für die Ueberlassung des Stalles und die Betreuung der Versuchsschweine und dem VLGZ Sursee für die Gratislieferung des Schweinefutters.
- Fräulein E. Ammann für die exakte Anfertigung der graphischen Darstellungen.
- Frau M. Zimmermann für die sorgfältige Schreibarbeit.

